

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de chirurgie

FACULTE DE MEDECINE
Professeur René P. MEGEVAND

**ETUDE ET REALISATION
D'UNE NOUVELLE TECHNIQUE DE PERFUSION
POUR LA CONSERVATION NORMOTHERMIQUE
D'ORGANES ISOLES**

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Jean-Bernard BUCHS

de

BELLEGARDE (Fribourg)

Thèse No 3630

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1977

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de chirurgie

FACULTE DE MEDECINE
Professeur René P. MEGEVAND

**ETUDE ET REALISATION
D'UNE NOUVELLE TECHNIQUE DE PERFUSION
POUR LA CONSERVATION NORMOTHERMIQUE
D'ORGANES ISOLEES**

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Jean-Bernard BUCHS

de

BELLEGARDE (Fribourg)

Thèse No 3630

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1977

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur René P. Mégevand, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 12 octobre 1977

Le doyen :
Marcel Jenny

Thèse No 3630



Je voudrais ici exprimer ma vive reconnaissance au professeur René P. Mégevand pour la confiance qu'il m'a accordée il y a quelques années déjà en acceptant de patronner ce long travail expérimental. Ceci a d'autant plus d'importance que nous ne possédions alors que les bases théoriques d'une technique dont nous ne soupçonnions pas encore toute la complexité de sa réalisation.

Toute ma gratitude va aussi à mon ami le docteur Anastase Spiliopoulos, qui a accepté de diriger la partie opératoire de ce travail et qui a été pour moi un enseignant précieux et irremplaçable en matière de transplantation et de médecine opératoire.

Mes remerciements s'adressent également à toutes les personnes qui d'une manière ou d'une autre m'ont apporté leur aide dans les moments parfois très difficiles de ce travail, ce particulièrement à mon ami le docteur Philippe Roch.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545909_0058

TABLE DE MATIERES

INTRODUCTION	5
A. Les vaisseaux	8
B. Les cellules	9
DESCRIPTION TECHNIQUE DU PERFUSEUR	12
1. La pompe dite pompe-organe	14
2. La pompe oxygénateur dite pompe-veineuse	14
3. Le support-collecteur	
4. L'oxygénateur	15
5. Le dialyseur	15
C. Mode d'emploi de notre perfuseur	15
Description et manipulation du set de perfusion	19
Protocole de mise en fonction	20
RESULTATS EXPERIMENTAUX	21
1. La technique de perfusion pulsatile	21
2. Les contrôles de bonne perfusion	21
3. La manipulation de la machine	22
4. L'entretien	22
Perspectives d'avenir	22
Le blocage du système réticulo-endothélial	22
Perfusion de foie isolé	23
Perfusion de coeur isolé	25
Perfusion du poumon isolé	26
REFERENCES	27

INTRODUCTION

En transplantation on se trouve actuellement confronté à trois tendances principales en matière de conservation d'organe. Nous disposons maintenant d'un recul suffisant pour pouvoir juger de la meilleure méthode à suivre en dehors de tout phénomène passionnel. En reprenant la littérature on voit qu'il existe un net désaccord entre les résultats expérimentaux et l'attitude clinique.

Pendant les années précédentes, les tendances étaient selon les zones d'influence, soit à la conservation ischémique froide après simple lavage de l'organe avec une solution froide, soit à la perfusion de l'organe isolé en hypothermie (de type pulsatile ou non).

Il est temps de dégager de ces différentes attitudes les conclusions qui s'imposent.

La technique la plus simple, la meilleure marché et par là probablement la plus utilisée est le simple rinçage de l'organe. Avec cette méthode, il a été possible de conserver des organes en ischémie froide jusqu'à 48 h. avec une moyenne de reprise fonctionnelle immédiate honorable. Cette technique ne permet la réalisation d'aucun test fonctionnel et une étude conduite en 1976 par R. E. McCrabe et coll. (1), comparant les scores obtenus soit après rinçage simple, soit après perfusion, montre une nette supériorité de cette dernière technique. Les techniques de flushing sont pour la plupart effectuées avec la solution de Collins (2) qui ne devrait avoir d'autre adjuvant que : 10.000 UI d'héparine/l ; les autres solutions qui peuvent être utilisées doivent être de composition intracellulaire.

La technique de perfusion quant à elle s'est développée à la faveur de conditions avant tout économiques ; elle est principalement l'apanage des pays riches et des centres de recherche en transplantation qui ont pu travailler conjointement avec des fabricants de machines, fabricants qui ont eux-même très souvent pris en charge les frais expérimentaux, ce qui a permis à ces centres de publier des grandes séries, qui ont fait foi, considérant plus souvent la quantité que la qualité.

La perfusion est très coûteuse et ne peut se justifier que si les résultats qu'elle propose sont supérieurs à toute autre forme de conservation ; et rappelons-nous qu'une forme de stockage quelle qu'elle soit ne peut faire d'un mauvais organe un bon organe, mais qu'une mauvaise perfusion peut rendre inutilisable un bon organe.

Actuellement les deux formes principales sont la perfusion pulsatile et celle à flux continu (non pulsatile). Sur le plan économique, le premier type est

beaucoup plus onéreux et la manipulation des machines plus complexe. Nous ne pensons cependant pas qu'il soit nécessaire pour autant de monopoliser un staff technique d'autant plus que le personnel dans les petits centres de greffe subit la même restriction que les fonds de recherche. En comparaison avec la technique de flushing, la perfusion peut présenter un risque supplémentaire inhérent à la machine : l'embolie d'air (3) ; les études menées sur ce sujet ont montré que les conséquences de cet accident sont assez minimes. Pendant la perfusion, on observe une augmentation de la pression diastolique traduisant une augmentation de la résistance vasculaire donc une diminution du flux. Or dans les deux heures qui suivent cet accident les paramètres hémodynamiques retournent dans l'ordre. Lorsque ces accidents se sont produits chez l'homme deux attitudes ont été adoptées : soit on a tout simplement abandonné ces reins, soit on a immédiatement procédé à un flushing et conservé ces organes selon la technique d'ischémie froide. Il est intéressant de voir, en recherchant ce qui a justifié ces attitudes de prudence, qu'il s'agit avant tout d'une précaution envers le liquide de perfusion. En effet, on utilise généralement des solutions préparées à base de plasma humain ; or ces solutions contiennent une fraction non négligeable de gammaglobulines dont l'action immunologique a été clairement démontrée par G. Mendez-Picon (4, 5) en mettant en évidence l'action lésionnelle moindre sur l'organe dans la même situation avec des solutions d'albumine pure. Lorsque la perfusion tombe en panne, on se trouve alors dans une situation de stase d'un liquide immunologiquement actif qui semble péjorer la survie ultérieure des greffons. De plus la perfusion hypothermique pulsatile impose la distinction entre deux situations : la perfusion sous basse pression et la perfusion sous haute pression. Cette distinction est d'importance comme l'a démontré F.B. Cerra (6). Le terme de haute pression signifie plus de 40 mmHg de pression moyenne et basse pression signifie moins 30 mmHg de pression moyenne. Dans le premier cas après réimplantation de l'organe, on assiste à une insuffisance rénale aigue (IRA) oligurique grave, alors que dans la seconde situation, la reprise fonctionnelle est immédiate.

Expérimentalement en hypothermie nous avons obtenus des résultats superposables. Nous pensons pouvoir expliquer ce phénomène de la façon suivante :

L'IRA (7) est la conséquence de l'ischémie totale ou partielle dont a souffert l'organe. Elle s'exprime soit dans sa forme gravissime, l'oligurie, soit dans sa forme bénigne, la polyurie.

L'arrêt de la filtration glomérulaire a 3 explications physiopathologiques :

- a. le gonflement des endothéliums (8)
- b. la diminution de la perméabilité de la membrane glomérulaire
- c. le spasme des artères afférentes (9)

En ce qui concerne le gonflement des endothéliums, il est évident que lorsque celui-ci se produit on va assister à une obstruction vasculaire qui va entraîner l'ischémie. Or le rein (probablement le cerveau et le coeur aussi) présente un phénomène irréversible que nous appelons le "NO-REFLOW" qui signifie la non reperméabilisation normales du cortex, même après retour à des conditions hémodynamiques normales. La régulation du volume cellulaire dépend de l'apport énergétique et en O_2 ; la séquestration du Na^+ dans le compartiment extracellulaire ne dépendant que d'un phénomène actif, cette pompe privée d'énergie va alors s'arrêter et la cellule va se gonfler. C'est ce phénomène qui

La perfusion a jusqu'à présent pratiquement toujours été conduite sous hypothermie profonde (vers 4°C). On pense pouvoir ainsi diminuer le métabolisme de l'organe - qui devient pratiquement nul dans de telles conditions - tout en assurant l'utilisateur que la perfusion est indispensable puisque'elle garantit une bonne oxygénation (aussi inutile en hypothermie) une bonne nutrition (tout aussi inutile) et une bonne élimination des produits du catabolisme - lui aussi pratiquement nul -. Sur les machines actuelles, il n'y a pas d'élimination, mais plutôt une dilution, étant donné que le liquide de perfusion circule en circuit fermé sans subir d'épuration ; d'autre part ces dits produits du métabolisme que l'on dit épurés et que l'on dose - à but pronostic - sont des substances qui ne font que refléter, en fonction de leur concentration, la lyse cellulaire.

Un récent rapport de A.R. Moossa (11) démontre que les résultats (considérant la reprise fonctionnelle de reins) sont les meilleurs dans des conditions de température entre $+10^{\circ}\text{C}$ et $+25^{\circ}\text{C}$, et que les scores étaient nettement moins bons au-dessous de 10°C .

Pourquoi alors perfuser en hypothermie ? La seule réponse est que la normothermie pose d'énormes problèmes. En effet la normothermie est une situation qui signifie conditions physiologiques. Or perfuser un organe dans des conditions physiologiques revient à le perfuser avec du sang complet dont on peut d'une manière ou d'une autre en assurer l'homéostasie, sous des conditions de pression circulatoire normale. Ce type de perfusion est réalisable dans deux situations bien définies :

1. L'emploi d'un circuit fermé avec un gros volume circulatoire pour un petit organe permettant aux petites modifications biologiques causées par le métabolisme de l'organe de n'induire que de très petites variations analytiquement décelables ; ce qui impose obligatoirement une durée expérimentale courte. A ces modifications biologiques s'ajoutent celles dues à la machinerie (e.g. hémolyse...).
2. La perfusion d'un organe de volume normal, mais avec un énorme volume circulatoire disponible, c'est-à-dire en circuit ouvert, en tenant compte aussi des remarques précédentes.

Devant une telle situation, il a fallu trouver une solution simple : l'hypothermie.

Nous allons essayer de montrer brièvement ce qui se passe dans cette situation. Un organe est composé de vaisseaux et de cellules et les répercussions de la basse température sur ces deux composantes ne sont pas les mêmes.

A. Les vaisseaux

L'organe isolé donc dénervé devrait répondre passivement aux variations de pression pendant la perfusion. L'expérience nous a montré qu'il n'en était rien. La première agression que subit l'organe est le choc froid lors du flushing avec la solution froide : il répond par un vasospasme. Ce spasme peut être évité si le rinçage s'effectue de telle sorte que la température descende graduellement. Pour éviter cet effet, certains auteurs utilisent la Procaine, qui selon Collins (1976) semble péjorer les organes.

Ce premier exemple démontre déjà que l'hypothermie est une technique qui impose une bonne connaissance des phénomènes biophysiques qu'elle occasionne.

Une des raisons principale qui a orienté vers l'hypothermie, est nous l'avons vu, pour éviter le sang. Aucun système connu de nous n'est capable de faire circuler du sang sans hémolyse. En hypothermie, on peut disposer d'un liquide adéquat qui n'est pas du sang :

Initialement, certains ont travaillé avec des solutions polyélectrolytiques, qui, si elles sont équilibrées du point de vue osmotique, n'en restent pas moins inutilisables lors de perfusion sous pression de longue durée. Ces solutions une fois mises sous tension vont créer un oedème intersticiel. Il est donc nécessaire d'utiliser des solutions iso-oncotiques au plasma, que l'on fabrique soit à partir de plasma, d'albumine ou de polymères de glucides. A noter que les conditions d'équilibre au niveau capillaire sont :

Pression capillaire = P. capillaire isogravimétrique

(le terme isogravimétrique voulant dire une pression à laquelle aucun échange net de liquide ne soit produit à travers la paroi capillaire).

or : P.C.I. = 0.93 la pression colloïdo-osmotique

Maintenant que l'on dispose d'une solution contenant des macro-molécules, et qu'on a déterminé les conditions d'équilibre, il est possible de perfuser. La diffusion au niveau capillaire à travers les pores devrait être légèrement diminuée puisque la basse température induit une diminution du calibre des pores. En fait dans les mêmes conditions de température, la viscosité du perfusé augmente. L'augmentation de la viscosité et la diminution de la diffusion au niveau capillaire crée une diminution des échanges par filtration d'un facteur X estimé à 10 % près, proportionnel à la diminution de température ; on peut schématiquement calculer :

$$\begin{array}{rcl} & & \text{à } 10^{\circ}\text{v} = 1.304 \\ \text{par exemple : } 10^{\circ} / 36^{\circ} = 1.85 = X & & \text{à } 36^{\circ}\text{v} = 0.718 \end{array}$$

autrement dit, les échanges par filtration ont diminué d'un facteur X proportionnel à la diminution de température, par rapport aux viscosités réciproques de l'eau.

B. Les cellules

Au niveau cellulaire, il faut distinguer 2 types de substances :

1. les liposolubles ($\text{O}_2\text{CO}_2\dots$) dont la concentration intracellulaire ne dépend pas d'un échange actif, ne vont pas modifier leur mouvement aux températures ici envisagées sous le terme d'hypothermie.
2. les hydrosolubles (e.g. Na^+ , K^+)
ici les échanges sont commandés par les lois osmotiques corrigées par des phénomènes actifs : les pompes, qui suivent les propriétés cinétiques des enzymes, c'est-à-dire que leur maximum d'activité se situe à une certaine température, activité qui peut être complètement bloquée à basse température. A partir de ce moment, ce sont les lois de l'osmose qui vont s'imposer et nous ne devons pas nous étonner des perturbations qui vont naître.

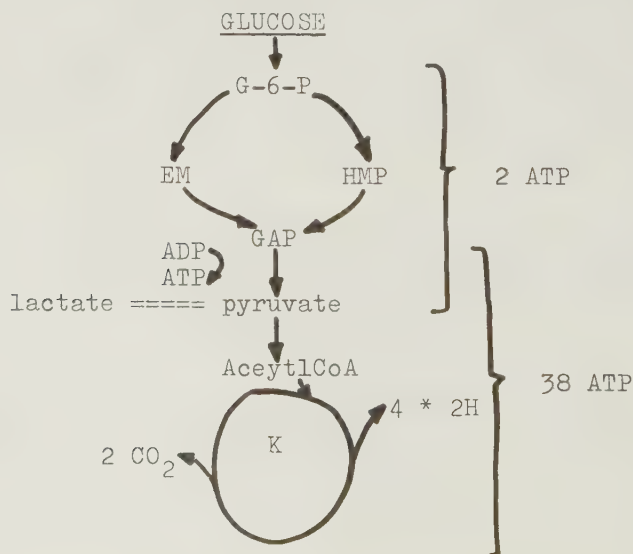
Devant cette situation, certains auteurs ont opté pour l'emploi de liquides de perfusion dont les caractéristiques chimiques sont celles du milieu intracellulaire.

Il semble évident que cette attitude est bonne, et si l'on considère leurs résultats expérimentaux, la bonne et rapide reprise des fonctions biologiques de leurs reins, une fois réimplantés, tout le monde devrait se joindre à leur protocole. Mais comme il a été dit avant, la température optimum testée (en dehors de la normothermie) se situe entre 10-25°, situation où les enzymes fonctionnent. En hypothermie modérée, on bloque partiellement le métabolisme ; mais il ne faut pas oublier que les systèmes les premiers touchés sont les systèmes les plus perfectionnés, et que les voies plus simples continuent à fonctionner, bien que ralenties. On assiste dans une certaine mesure à l'accumulation de substances intermédiaires qui peuvent bloquer complètement les autres systèmes. Ceci nous impose à être prudent et judicieux dans le choix du substrat énergétique fourni à l'organe.

La tendance actuelle de la littérature est d'admettre un certain échec dans la perfusion. Ce que la plupart des expériences montrent plus ou moins nettement, c'est que le facteur limitant dans la conservation d'organes est le mauvais métabolisme par manque d'oxygène disponible.

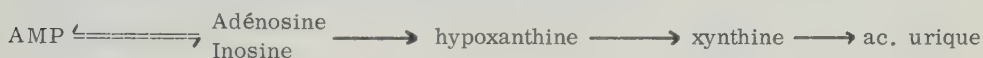
L'oxygène peut manquer en valeur absolue : c'est le cas dans toutes les situations hypothermiques, principalement par manque de vecteur du gaz au récepteur. L'oxygène peut manquer aussi en valeur relative, à cause de la mauvaise distribution du flux et des mauvaises conditions de pression circulatoire.

Lorsque l'oxygène diminue, le métabolisme énergétique se fait en dehors des voies oxydatives. Une mole de glucose selon les voies oxydatives fournit



38 moles d'ATP ; en anaérobiose seules 2 moles sont fournies. La glycolyse anaéro-bique laissera s'effondrer la réserve d'ATP cellulaire, le manque d'ATP augmente la perméabilité lysosomiale laquelle libère alors dans la cellule les enzymes lysosomiaux qui vont provoquer la nécrose cellulaire. Simultanément, la glycolyse anaéro-bique fera s'accumuler l'acide lactique dans la cellule et le pH va baisser ce qui permettra l'activation des enzymes lysosomiaux.

La réserve d'ATP cellulaire est très faible et la consommation énergétique de la cellule est très grande. Dans la situation oxydative normale la rephosphorylation de l'ADP ne pose aucun problème de bilan, mais en absence d'oxygène, non seulement l'ATP est consommé sans resynthèse mais encore son catabolisme est poussé plus avant afin de récupérer les deux autres liaisons à haute énergie. On entre alors dans la cascade catabolique des purines.



Il est évident que seul le foie peut pousser le catabolisme aussi loin. Au niveau de l'organe isolé, l'adénosine et l'inosine diffusent hors de la cellule. Mais les bases purines sont perdues et même si alors on redonne de l'oxygène, elle ne seront plus là pour la resynthèse de l'ATP. Lors de perfusion de foie, il faut à tout prix bloquer cette réaction car après la xanthine, la réaction est irréversible ; ceci peut se faire grâce à l'Allopurinol (12). On peut légitimement se demander pourquoi cette réaction se poursuit au-delà de l'AMP, puisqu'aucun gain d'énergie ne peut être espéré. On fournit deux explications, tout d'abord la loi d'action de masse par accumulation d'un des composés en réaction et ensuite parce que l'augmentation de l'acide lactique a pour corrolaire l'ouverture du shunt des pentoses avec formation de ribose-P, brique stimulant la synthèse des purines. La cellule se trouve alors devant un excès de purines qu'elle doit éliminer.

En résumé, le manque d'ATP va se répercuter partout où il faut de l'énergie. Tous les mécanismes de transport actif transmembranaire vont s'arrêter. La cellule ne peut plus retenir son K^+ et va se "noyer" sous le Na^+ . La cellule se gonfle et elle se lyse.

Lors de manque d'oxygène, la cellule va mourir de deux manières soit par éclatement à la suite du gonflement soit par nécrose.

Le manque relatif d'oxygène ne doit pas être minimiser surtout lorsque l'on utilise une machine de perfusion. Ce manque sera dû à deux causes principales, d'une part l'hypotension et d'autre part la mauvaise distribution du flux. La pression mesurée dans l'artère d'un organe perfusé est déterminée par la pression dynamique de la pompe et par la résistance vasculaire. La résistance vasculaire dans l'organe isolé n'est pas due à une autorégulation de type myogénique, comme trop d'auteurs ont voulu le démontrer et qui pour ceci préconisent des perfusions à basse pression. En ce qui concerne le rein, nous avons appris par Swann (13), Stahl (14) et Hendry (15) qu'en l'absence d'une distension suffisante des vaisseaux par une pression artérielle suffisante, le réseau vasculaire de l'organe se ferme jusqu'à 68 % de son volume fonctionnel. Il a été calculé que la valeur de 10 mmHg comme pression capillaire glomérulaire est la valeur critique au-dessous de laquelle le flux passe à travers les shunts artério-veineux.

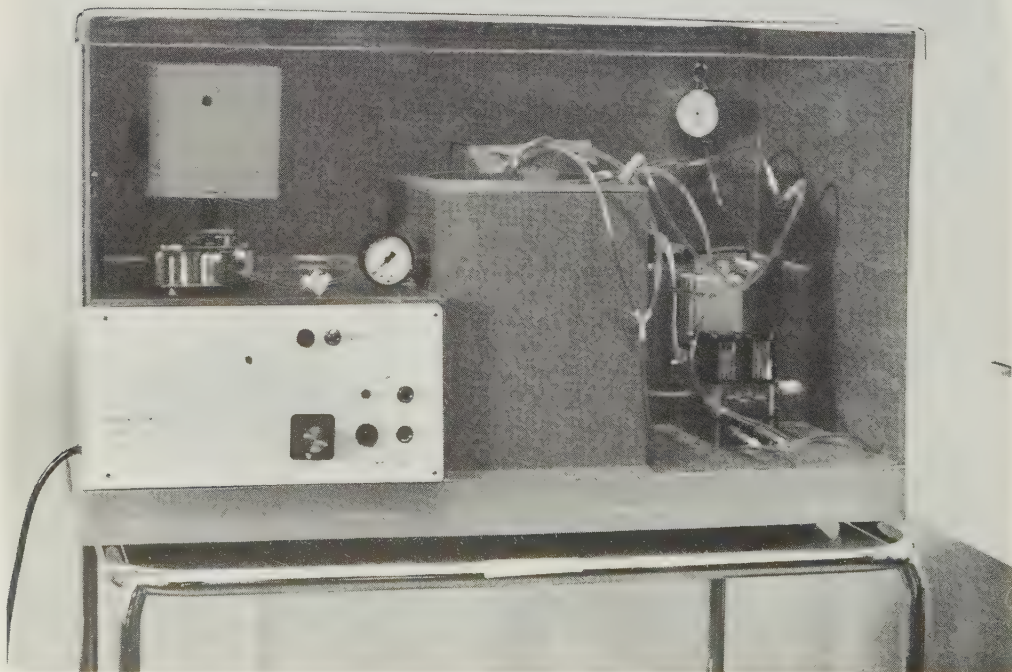
De plus, la pression circulatoire non seulement conditionne la distribution du flux mais aussi le débit donc dans une certaine mesure la disponibilité en O_2 au niveau tissulaire. L'ischémie relative aura comme cible première les cellules endothéliales qui alors se gonfleront et une ischémie totale s'établira distalement.

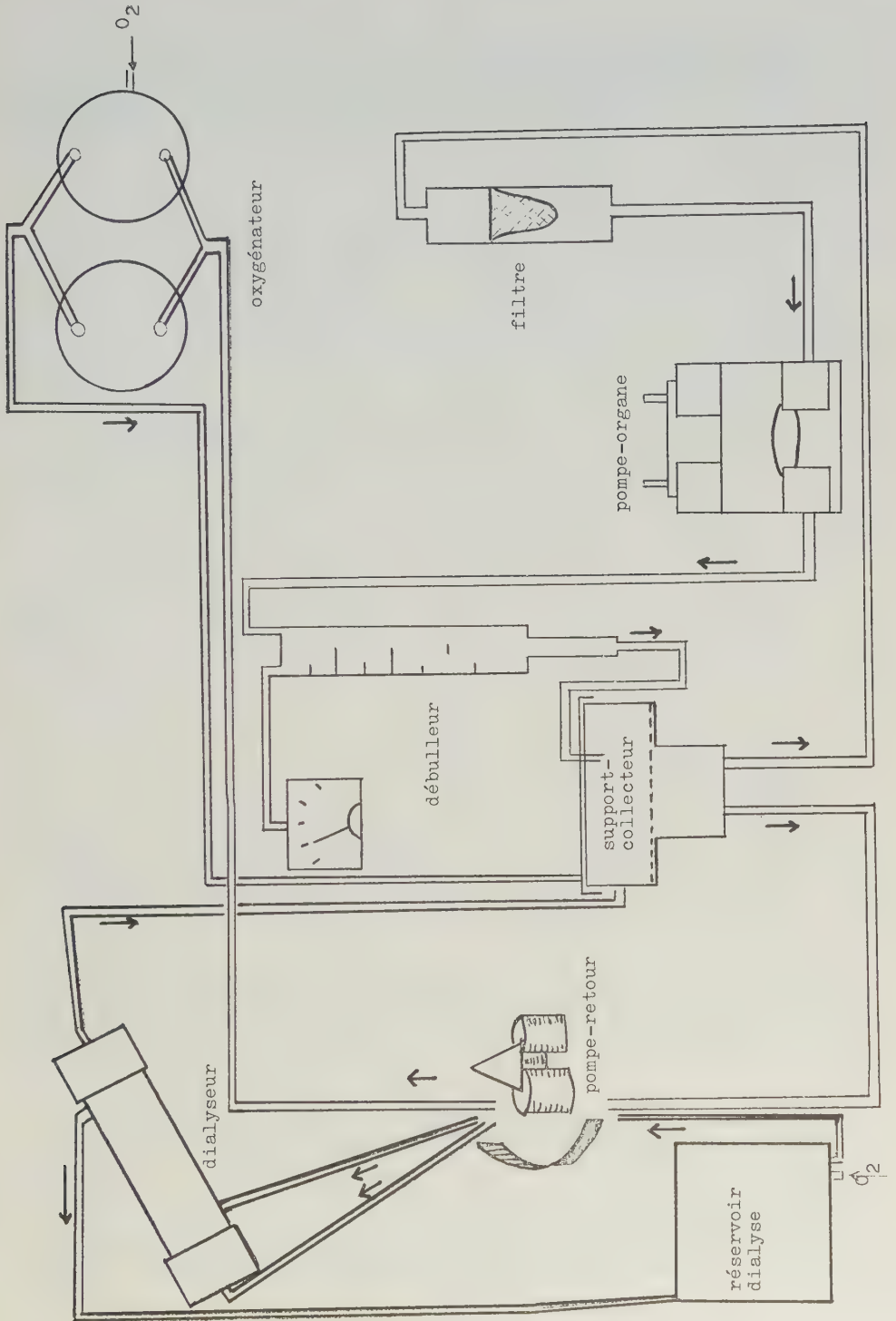
La morphologie du flux (pulsé ou non) nous semble prépondérante et bien qu'aucune démonstration péremptoire n'ait été faite à ce jour nous créditons la technique du flux pulsé. Agishi (16) propose une explication très séduisante dans une optique purement vasculaire reposant sur la conception non uniformément élastique des parois vasculaires qui justifierait la pulsatilité ; mais on doit probablement trouver d'autres explications au niveau des échanges cellulaires.

Lorsque l'on parle de pulsatilité, encore faut-il s'entendre sur la définition de ce mot. C'est pourquoi il faudrait plutôt qualifier le flux en % de pulsatilité par rapport à un débit continu sous-jacent.

C'est donc en tenant compte des remarques ci-dessus dont la liste est loin d'être exhaustive que nous avons mis au point une machine que nous destinons à la perfusion normothermique. Nous utilisons un perfusé de type extracellulaire et le transport des gaz est assuré par de l'hémoglobien libre, laquelle protéine assure aussi la pression-colloïdo-osmotique.

DESCRIPTION TECHNIQUE DU PERFUSEUR





1. La pompe dite pompe-organe (17-24)

Il s'agit d'une pompe à membrane en plexiglas, par ce fait, le liquide de perfusion est en contact avec 2 parties de la pompe : la membrane et la tuyauterie. La tuyauterie étant travaillée dans un bloc en plexiglas peut être facilement stérilisé (deux blocs sont à disposition l'un étant toujours prêt à l'emploi). La membrane quant à elle est en caoutchouc elle est donc stérilisable ou à usage unique.

Nous devons la réalisation de ce système au Dr Holger Nyström+, qui nous a confié son premier prototype dans la technique médicale. Sur cette pompe, on peut régler séparément 3 paramètres : la fréquence, le volume et la pression.

A. La fréquence : Le système étant pulsatile, nous avons donc un temps de remplissage (diastole) et un temps d'éjection (systole). Ces deux durées se règlent séparément. Avec cette pompe, le temps de diastole conditionne le volume disponible pour la systole.

B. Le volume : La pompe est limitée par un volume maximum (notre modèle : 20 cc), mais il est possible d'utiliser un modèle supérieur jusqu'à 100 cc. Ce volume maximum correspond au volume d'éjection maximum, il est possible de le réduire en jouant sur la fréquence, sans forcément changer le rythme. Une fois le volume désiré réglé, la reproduction entre chaque systole est garantie au 1/10ième de gramme, pour autant que la source d'énergie soit stabilisée.

C. La pression : La pression du liquide circulatoire est réglée par la pression que l'on impose à la membrane (ce modèle permet de travailler jusqu'à 3 kg / cm²). Afin de régler la pression de perfusion, il suffit d'adapter la pression sur la membrane à la valeur choisie au niveau de l'artère.

Cette pompe est alimentée électriquement sous une tension de 24 V alternatif. La force est donnée par de l'air comprimé.

2. La pompe oxygénateur dite pompe-veineuse

Afin d'assurer la circulation de retour vers la pompe-organe à travers un oxygénateur et un dialyseur, il est indispensable d'utiliser une seconde pompe. Dès lors en circuit fermé se pose le délicat problème de l'équilibre des débits entre les deux systèmes, et ce d'autant plus que l'on dispose d'un côté d'un flux pulsé et de l'autre un flux continu en pression positive.

Nous avons opté pour un montage semi-ouvert c'est-à-dire que le retour après la dialyse se fait dans le support-collecteur dont une partie peut être court-circuitée directement vers le système de remplissage de la pompe-organe, court-circuit que l'on utilise en général uniquement au début de la perfusion pour purger le montage.

Le retour du liquide à la pompe-organe est assuré par celle-ci en pression négative, en aspirant le liquide dans le support-collecteur lui-même alimenté par la pompe-veineuse.

3. Le support-collecteur

La réalisation de cet accessoire est en PVC dit alimentaire correspondant aux caractéristiques toxicologiques de W. Geertz et coll. (21, 22).

Sa géométrie permet de perfuser n'importe quel organe - même le poumon puisqu'il a été prévu sur le couvercle un orifice pour le passage du tuyau de ventilation. Sur le couvercle se trouve un second orifice pour la canulation artérielle de l'organe. Le retour veineux s'effectue librement dans le collecteur.

Ce système permet de pratiquer des artériographies pendant la perfusion. Le schéma ci-contre montre la disposition de la plaque et l'incidence du rayon. Cadrage : petit-foyer à un mètre ; puissance 55 kV avec 250mAs ; film 4006 sans écran renforçateur. Liquide de contraste : Urographin^R. Avec ce format de support nous employons le système thermostatique : Assistant-Thermostat no 3185 WTE.

4. L'oxygénateur (23-26)

Sur notre montage actuel, nous utilisons l'oxygénateur à membrane 5MO321 de Travenol Lab. Cet accessoire à usage unique permet un débit de 1 l. / minute sous une pression maximum de 200 mmHg.

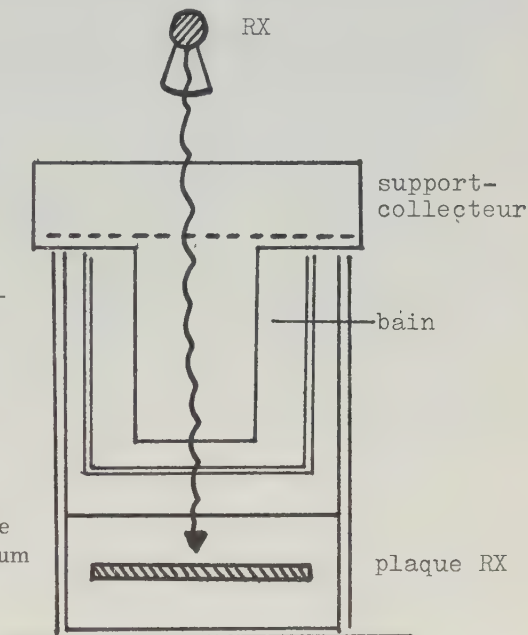
5. Le dialyseur (27-28)

Travailler en normothermie en circuit fermé impose l'utilisation d'un dialyseur. Pour ceci, nous utilisons le modèle 4 (C-DAK) de Cordis Dow. Son encombrement n'est que de 10 cm X 24 cm. Le volume sanguin est de 100 ml, il assure un débit jusqu'à 500 ml / minute. La pression transmembranaire maximum est de 500 mmHg, garantissant une ultrafiltration de 2 ml / heure par mmHg de pression transmembranaire.

C. Mode d'emploi de notre perfuseur

De par sa conception, notre machine peut sembler compliquée, on y propose en effet beaucoup de paramètres qui peuvent se régler séparément. Nous allons voir que la réalité est un peu plus simple. En fait si chacun peut choisir à sa convenance les paramètres de perfusion qui lui semble les meilleurs, nous avons quand même établi un schéma de base.

Tout d'abord, nous avons choisi de perfuser à fréquence constante, fréquence que nous avons fixée à 60 puls / min. que l'on règle de la façon suivante : systole sur 1 et diastole sur 3. Nous avons en effet remarqué que les machines qui travaillent à trop haute fréquence créent plus de complications qu'elles n'apportent de solutions. D'autre part ce que l'on cherche avec un système pulsatile c'est d'avoir un temps de diastolique où la pression est très basse, chose qui n'est plus possible si la fréquence est trop élevée.



Une fois le perfuseur enclanché, commencer toujours par placer les 2 régleurs de la pompe sur 10, ceci permet, une fois le liquide mis en circulation de purger complètement la chambre de mise sous tension. Lorsque l'on ne voit plus sortir d'air de la pompe, on peut ramener la fréquence aux valeurs proposées.

Il est évident que le liquide ne circulera sous pression que lorsque la pompe aura été mise elle même sous pression. Pour ceci, sur la paroi droite de l'appareil se trouve l'entrée pour l'air. Sur la gauche du perfuseur, un manomètre gradué jusqu'à 3 atmosphères indique un des paramètres qui sera des plus importants pendant la perfusion.

Mettre la pompe sous tension (UNIQUEMENT AVEC DE L'AIR COMPRIME), en faisant monter la pression progressivement jusqu'à 0.5 atm. Une fois cette valeur obtenue, lire le manomètre pression organe, branché sur le débulleur, et quelque soit la valeur affichée, le mettre sur zéro. Diminuer ensuite la pression jusqu'à 0.1 atm et procéder à la mise en perfusion de l'organe.

A partir de ce moment, monter lentement la pression dans le système jusqu'à une pression systolique d'environ 80 mmHg. LIRE alors la valeur affichée sur le manomètre de gauche, ceci sera la valeur de référence pendant toute la perfusion.

En effet, dès lors diverses situations vont se présenter à l'utilisateur :

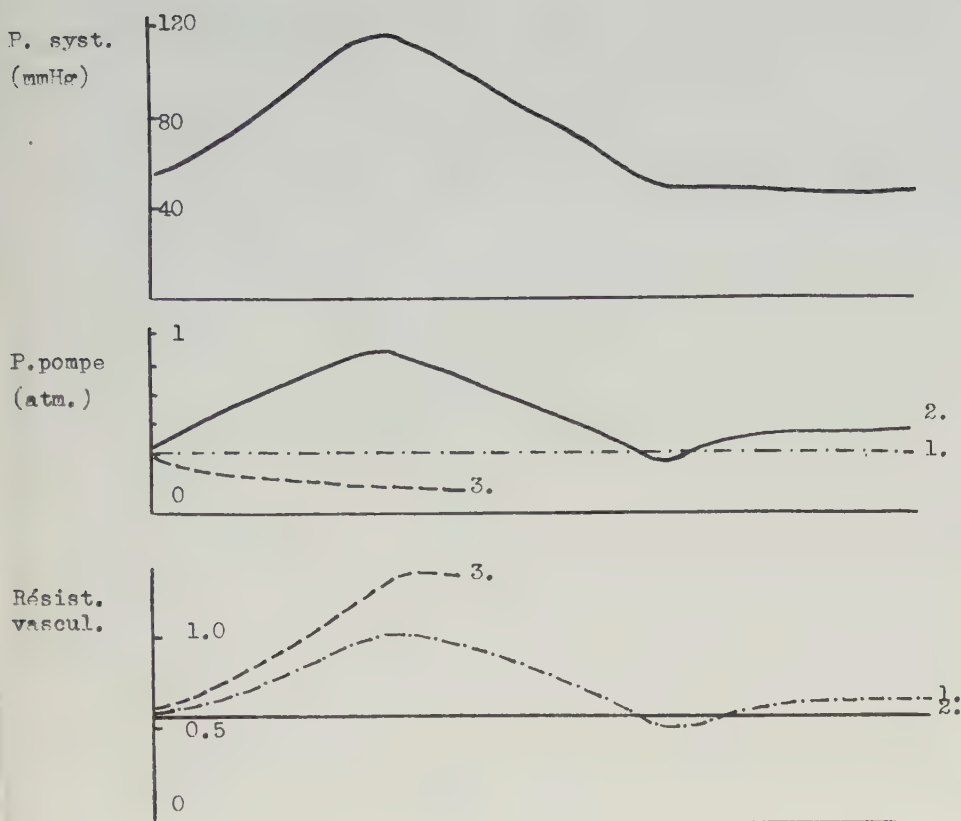
- soit la pression systolique affichée a augmenté, il est alors possible de revenir à la valeur initiale uniquement en diminuant la pression d'air comprimé. Avant d'effectuer la correction, lire la valeur sur le manomètre de pression sur la pompe, soit ce dernier affiche la même valeur qu'au départ, dans ce cas, la résistance de l'organe a augmenté, soit la valeur affichée a elle aussi augmenté, ce qui signifie que l'installation d'air comprimé n'est pas stable (cette situation, sauf si elle présente de grosses variations, n'est pas grave).
- soit c'est l'inverse que précédemment, c'est-à-dire que la pression systolique a diminué, dans ce cas, manipuler l'appareil en conséquence et en tenant compte des remarques ci-dessus.

Cette dernière situation est évidemment plus encourageante (si elle n'est pas due à une chute de la pression de l'air comprimé) puisque si l'on se fie sur la viabilité des greffons en fonction de la diminution de leur résistance vasculaire, ceux-ci semblent meilleurs.

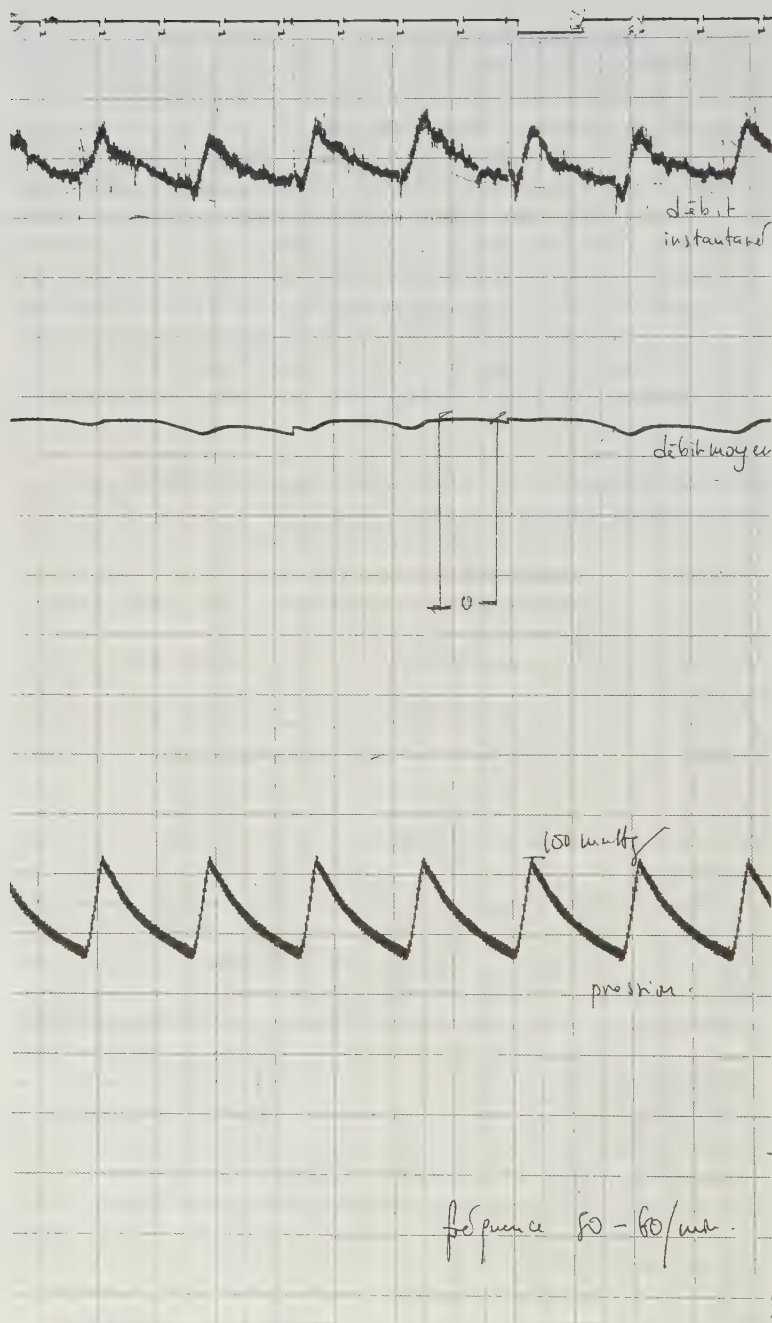
Ce système de pompage offre l'avantage de pouvoir perfuser à fréquence constante quelque soit le débit. Ce débit étant absolument pulsé, le volume délivré par pulse veut l'inégale de la courbe du débit ; il n'a donc pas été possible de placer un débitmètre simple et bon marché sur le perfuseur. Un petit artifice mathématique permet quand même de se faire une idée de la résistance vasculaire, en calculant une valeur Y qui n'a aucune correspondance physique : c'est le rapport :

Pression systolique

Pression pompe



1. vasospasme réactionnel . Pronostic : bon rein (R. vascul. = normale)
 2. artifice dû à une source d'air comprimé instable (R. vascul. = normale)
 3. Phénomène de "rising pressure" (R. vascul. = rising pressure)
- Pronostic : mauvais rein .



Avec l'habitude, l'extrapolation de Y et de la résistance vasculaire ne présente plus de problème.

A noter : si la fréquence et le débit sont trop élevés avec une P. diastolique qui ne redescend pas assez bas, il faut alors diminuer la fréquence (par exemple en augmentant le temps de diastole).

Le débulleur : son niveau se règle en ouvrant le carrefour sur le tuyau du manomètre de pression-organe. Si on laisse sortir de l'air, le niveau va monter et si on injecte de l'air à l'intérieur, le niveau va descendre. Ce niveau doit être fixé à une hauteur telle qu'aucune bulle formée n'atteigne la sortie. Il permet aussi de régler un amortissement de l'onde systolique.

Description et manipulation du set de perfusion

Ce set de perfusion à usage unique et fabriqué en PVC alimentaire, il est stérilisé à l'oxyde d'éthylène à froid.

Il est composé de 3 parties à assembler au moment de la perfusion.

1ère partie

Ce premier bloc constitue le retour à la pompe organe. Il comprend une tubulure en silicone pour la pompe veineuse ainsi que les raccords pour l'oxygénateur (en cas d'hypothermie) ou pour le dialyseur (en cas de normothermie). L'effluent de l'oxygénateur ou de la dialyse est directement conduit au filtre, le quel est muni d'un raccord en Y dont l'une des branches assure l'aspiration directement au sachet-collecteur et l'autre le retour direct. Pour des raisons d'équilibre du débit, sur le retour direct se trouve un robinet trois voies qui permet un court-circuit vers le support-collecteur. Généralement pendant la perfusion, le liquide va circuler vers le support-collecteur, alors que l'amorçage du système ainsi que la purge impose de travailler avec une circulation du retour direct dans le filtre.

2ème partie

Le principal composant est le débulleur, dont le niveau peut être fixé (comme vu avant) à la valeur que l'on désire pour modeler la forme de l'onde systolique, mais un minimum doit être garanti pour éviter que des bulles passent à l'organe.

Nous travaillons en principe autour des valeurs 20 à 25 ml. Au sommet du débulleur se trouve un raccord pour le manomètre de monitoring de la pression de perfusion réelle.

3ème partie

Il s'agit du support-collecteur, de son couvercle ainsi que de la tuyauterie de retour : une voie à dr pour le retour directe à la pompe-organe, une voie gauche pour le retour à la pompe-veineuse. Le couvercle est percé de 3 orifices : un pour la canulation de l'artère de l'organe, un pour le court-circuit du retour direct, et un dernier plus gros pour le passage de la canule à ventilation (comme c'est le cas lors de perfusion pulmonaire).

Protocole de mise en fonction :

1. remplir stérilement le support-collecteur avec la solution de perfusion,
2. mettre en marche la pompe-veineuse et remplir tout le système de retour,
3. enclancher la pompe-organe (environ 25 / min), monter progressivement la pression de l'air comprimé jusqu'à ce que le liquide circule,
4. une fois que toute la tuyauterie et tous les accessoires sont remplis, enclancher l'oxygène ; ajuster le volume du perfusat en remplissant le support-collecteur jusqu'à ce que le volume du perfusat dans le support atteigne le niveau de l'organe,
5. ajuster les paramètres aux valeurs désirées, en prenant soin de **fixer le zéro** sur le manomètre de pression de l'organe,
6. placer l'organe et perfuser.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Avec une cinquantaine de perfusions de reins et de rates, nous avons acquis actuellement une certaine expérience dans la manipulation de cette machine. Dans cette première série d'expériences, nous avons à tort introduit des paramètres variables et nouveaux pour nous, de sorte qu'il est souvent difficile, dans cette analyse de conservation d'organes, de remettre chaque chose à sa juste place. Nous avons cependant retenu les conclusions suivantes :

1. La technique de perfusion pulsatile à pression variable présente les mêmes exigences initiales que les autres méthodes, à savoir : prétraitements du donneur avec 30 mg / kg de méthylprednisolone 2 h. avant le prélèvement (en accord avec L.H. Toledo-Pereyra et Coll.), le maintien d'une diurèse correcte (Mannitol, Furosémide, Fluides) avant et pendant l'intervention, et un flushing hypothermique correcte de l'organe. Dans la première partie de nos expériences, nous avons nettement minimisé l'importance de ces facteurs qui ont été en partie responsables de nos échecs.

2. Les contrôles de bonne perfusion : dans cette première série d'expériences, où le temps maximum de perfusion a été fixé à 8 heures, nous n'avons pas systématiquement suivi les paramètres biologiques (sur le set, un accès 3 voies est prévu pour les prélèvements).

Sur les perfusions de longue durée, nous suivons : LDH, Na⁺, K⁺, glucose, ainsi que l'osmolarité pour les perfusions normothermiques.

Un de nos échecs est dû au fait qu'un des sachet-collecteurs était percé et de ce fait il s'est établi un contact direct entre le perfusé et le liquide de refroidissement (prouvé grâce à l'osmolarité avant et après la perfusion du perfusé).

Certains expérimentateurs aiment avoir comme preuve de bonne perfusion une artériographie, permettant de visualiser la perfusion corticale ; cette condition est parfaitement réalisable sur notre machine qui est radiotransparente (pour ceci, nous procédons comme suit : cadrage (antéro-postérieur) petit foyer à 1 m. ; puissance : 55kV avec 250 mAs ; Film : 4006 sans écran renforceur - le film étant placé sous le sachet-collecteur, dans la cuve, et la source devant la machine -). Nous offrons à cette technique un maximum de crédit, car elle est la meilleure et la plus simple comme contrôle fonctionnel de la corticale.

En ce qui concerne le contrôle de la résistance vasculaire, nous tenons ici encore à rappeler, qui si théoriquement une diminution de cette résistance est un bon indice de pronostic fonctionnel, il faut être très prudent dans son interprétation ; en effet, au cours de cette série, nous n'avons jamais observé de phénomène de "rising pressure", et nous avons cependant constaté des cas, où après réimplantation on n'obtenait aucune perfusion corticale ; or sur la machine, les

scores étaient particulièrement bons avec spécialement une importante diminution de la résistance vasculaire pendant la perfusion, que nous avons interprété comme un shunt cortical avec ouverture maximum des arciformes (cf. avant dans la partie traitant de la perfusion pulsatile sous hypothermie).

Tous les problèmes de contrôle pendant la perfusion, qu'elle soit de courte ou de longue durée, sont pour nous extrêmement importants, puisque nous prétendons disposer d'une machine de manipulation simple. Nous pensons de plus qu'il doit exister une technique de perfusion simple et reproductible pour la conservation d'organes, faute de quoi tout essai d'utilisation de cette technique en routine clinique sera vouée à un échec certain.

3. La manipulation de la machine : elle est facile et ne demande que deux éléments à surveiller, d'une part - si l'on utilise le système de refroidissement avec la glace - de rajouter de la glace toutes les 4 heures, d'autre part de contrôler la pression de perfusion, et ce d'autant plus que la source d'air comprimé est instable.

4. L'entretien : il est rendu très simple par l'emploi des sets à usage unique (très bon marché). Le reste de la machine se nettoie avec un tampon alcoolisé. Un point délicat : la stérilisation de la pompe : étant donné sa construction, la partie qui est en contact direct avec le liquide de perfusion est taillée dans un bloc de plexiglas, nous stérilisons ce bloc à froid à l'oxyde d'éthylène.

Perspectives d'avenir

Il peut sembler un peu précocement pour parler déjà de perspectives d'avenir, alors que l'on dispose d'un montage encore expérimental. Mais, nous l'avons dit dans la partie introductive de ce travail, nous n'avons choisi le rein que comme modèle d'essai, et il est indispensable d'arriver à démontrer que ce qui est vrai pour un organe l'est aussi pour un autre. Il est certain qu'il faut alors se munir de certaines précautions ; qu'il faut appliquer des modifications à la machine. La machine de base doit être polyvalente.

Nous allons citer quelques exemples, la liste n'est pas exhaustive, peut-être est-elle trop optimiste ?

Le blocage du système réticulo-endothélial

La perfusion d'un organe qui contient une quantité non négligeable de cellules histiocytaires du SRE avec une solution contenant de l'hémoglobine libre pose le problème du catabolisme de cette protéine.

La bilirubine ainsi produite, lors de perfusion normothermique, ou même la séquestration de l'Hb dans l'histiocyte en hypothermie est incompatible avec une survie in-vitro de l'organe. Il faut pouvoir bloquer le SRE pendant la durée de la perfusion.

Les nombreuses expériences menées au cours de cette première moitié du XXème siècle sur l'étude du SRE nous ont été d'une aide précieuse. Parmi ces expérimentateurs citons R.H. Jaffé (29), Jungeblut (30), Berlot, P.B. Beeson (31) et plus récemment M.S. Litwin et coll. (32). Le blocage ressemble à un phénomène dynamique par compétition pour un transporteur membranaire, puisque le

maximum de l'action bloqueuse se fait pendant la période de séquestration de l'agent bloqueur dans l'histiocyte, et que une fois celui-ci "plein" de cette substance, il montre alors une tendance à capter l'élément que l'on désire protéger. L'effet de blocage sera d'autant plus efficace que l'élément bloquant montrera une meilleure affinité pour l'histiocyte, dans l'ordre : le thorotraste, le bleu Trypan. Or le mélange Hb - Bleu Trypan donne une couleur violette. Pour pouvoir doser photométriquement ces deux composés séparément, nous avons calculé les pics d'absorption maximum à 620 nm pour le bleu Trypan contre la solution d'HbO₂ pure qui sera le blanc et à 540 nm pour l'Hb contre la solution de bleu Trypan pure.

Jungeblut et Berlot ont observé que, lorsque l'on bloque le SRE du foie avec le bleu Trypan, cet organe diminue son métabolisme. Cette diminution doit être suffisamment importante pour avoir pu être dosée avec les méthodes de l'époque c'est-à-dire la gazométrie volumétrique. Cette diminution du métabolisme montre un maximum dans l'heure qui suit l'injection et dure tout en remontant progressivement environ 8 heures.

On comprend l'intérêt que nous portons à ce blocage puisque nous utilisons de l'Hb dans une solution que nous espérons polyvalente.

Perfusion de foie isolé (33-38)

Initialement, nous avons pensé à deux buts pour la perfusion hépatique, le premier, la pseudo-perfusion hétérologue et le second la conservation pour transplantation.

Qu'est-ce que nous entendons par pseudo-perfusion hétérologue ? Il existe depuis quelques années une technique de perfusion hétérologue de foie de porc comme traitement de l'insuffisance hépatique aigue (I.H.A.). S'il est certain que cette technique a à plusieurs reprises fait ses preuves, il n'en reste pas moins que la plupart des cas ainsi traités se sont soldés par des échecs. Parmi les nombreux facteurs étiologiques de ces échecs, nous retenons particulièrement l'hémolyse assez importante causée par les montages mécaniques. Cette hémolyse est d'autant plus importante, à temps de circulation égale avec la C.E.C. de la chirurgie cardio-vasculaire, qu'elle ne peut pas bénéficier des techniques de compensation qui permet une diminution de l'hémolyse en C.E.C. pour la chirurgie cardio-vasculaire, à savoir hémodilution et hypothermie principalement.

Il semble alors évident qu'il serait intéressant de travailler sur un troisième secteur n'ayant aucun contact direct avec le sang du candidat à la perfusion hétérologue.

Nous appelons cette technique pseudo-perfusion hétérologue.

Historiquement, nous savons qu'avec l'apparition du rein artificiel on avait fondé des espoirs quant à son utilisation dans l'insuffisance hépatique, mais bien vite on s'est rendu compte que si ce traitement corrige il est vrai les nombreux désordres électrolytiques classiques de l'I.H.A., on n'améliorait en rien le pronostic de ces malades. Force en était de conclure que dans l'I.H.A., les troubles de cette pathologie se répercutaient sur des agents non-dialysables, et la preuve en a été pratiquement apportée par les améliorations constatées après exsanguino-transfusion.

Si nous restons spéculatifs, on est en droit de penser que si l'on arrivait à "dialyser" ces substances, du sang vers un troisième secteur, secteur qui serait le milieu de perfusion du foie isolé, on pourrait substituer ainsi la fonction déficiente du foie. Cette hypothèse impose la perfusion normothermique du foie isolé, ce qui sous-entend dans notre propos la solution à base d'hémoglobine.

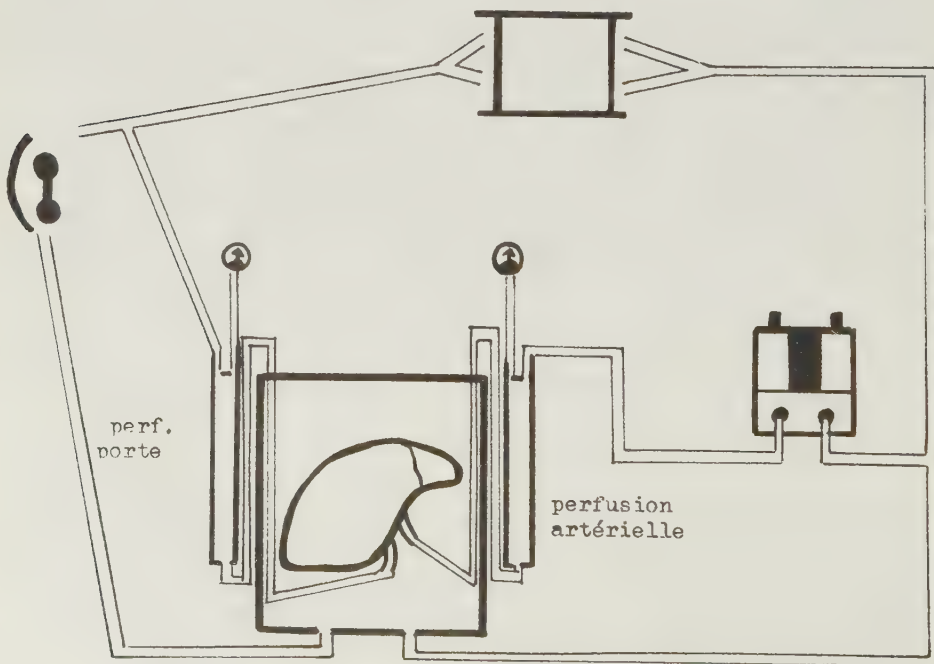
Une telle technique nécessite l'étude de membranes de dialyse à porosité sélective, qui en tous cas devrait laisser passer la bilirubine, puisque cette dernière, si elle n'est pas l'agent principal du drame dans l'I.H.A. n'en est pas moins la seule substance dont on ait pu démontrer l'étroite corrélation entre son taux et l'importance du coma. De plus, si cette technique s'avérait possible, il faudrait modifier certains éléments mécaniques de notre machine en prenant soin de placer à la sortie du patient une colonne échangeuse d'ion pour retenir les ions NH_4^+ .

Mais quelques soit la technique de perfusion, le blocage du SRE est indispensable si l'on utilise de l'hémoglobine.

Nous avons retenu comme second but de perfusion hépatique celui de la conservation pour la transplantation. Cette technique, nous pouvons facilement l'adapter sur notre machine, mais il faut tenir compte de certaines modifications à apporter au montage des sets de perfusion.

Elle impose également un blocage du SRE.

Schéma du montage pour perfusion hépatique (normo ou hypothermique)



Perfusion de coeur isolé

Nous savons que dans ce domaine, plus que partout ailleurs, toute augmentation du délai entre le moment du prélèvement et l'implantation est la seule garantie de pouvoir disposer d'un nombre plus grand de donneurs. A l'heure actuelle, ce délai ne peut pas dépasser 2 heures, ce qui fait qu'en plus du nombre extrêmement limité déjà de donneurs répondant aux critères de transplantation s'ajoute le grave problème de la brièveté du temps intermédiaire, ce qui amène en plus de la limitation sélective une limitation spacio-temporelle.

Un espoir est né il y a déjà quelques années avec les travaux préliminaires de W.M. Riedesel et coll. (39), qui ont démontré qu'il est possible de conserver en extracorporelle des coeurs grâce à la perfusion normothermique avec une solution d'hémoglobine sur un temps de 6 heures environ. Nous tenons à rapprocher à cette expérience le système de self-perfusion employé et le système de self oxygénation (préparation coeur-poumon). Or l'analyse des résultats montre clairement que ce sont les troubles respiratoires qui commencent et qui vont ensuite entraîner une défaillance cardiaque. La perfusion isolée de coeur propose les avantages de cette technique tout en évitant les ennuis respiratoires.

Schéma du montage

Le même que pour le rein, avec canule artérielle dans l'artère sous-clavière.

Perfusion du poumon isolé

L'expérience nous a appris en matière de transplantation pulmonaire que la ventilation occupe une place importante qui permet d'améliorer les scores en post greffe de la fonction de cet organe. Elle évite principalement les surinfections sur les atélectases pendant la conservation et elle diminue l'impédance pulmonaire. Sur le plan circulatoire, nous opérons comme pour le rein avec un débit diminué, mais avec une pression normale.

Le poumon présentant les mêmes qualités que le foie en système réticulo-endothélial, un blocage de ce système semble s'imposer. Le schéma de montage est le même que le rein (canulation artérielle sur l'artère pulmonaire) avec en plus l'accès à la canule de ventilation.

REFERENCES

1. R.E. McCrabe, D. Lorieo, A. Wildstein, W.G. Raney, M.F. Fitzpatrick, Short-term kidney preservation : To perfuse or not to perfuse. Trans.Amer.Soc. Artif.Int. Organs, 1976, 22, 207.
2. G.M.Collins, N.A. Halasz. 48 hour ice storage of kidneys : importance of cation content. Surg. 1976, 79, 432.
3. Hossein Eslami, S. Ribot. Air embolization during the machine preservation of kidney. Surg. 1976, 79, 356.
4. G. Mendez-Picon, C. Belle, J.C. Pierce, F. Thomas, M. Murai, J. Wolf, H.M. Lee. Use of plasma protein fraction in preservation of cadaveric kidney. Surg. 1976, 79, 364.
5. L.H. Toledo-Pereyra, R.L. Simmons, L.C. Olson, J.S. Najarian. Perfusion time and the survival of cadaver transplants. Surg. 1976, 79, 377.
6. F.B. Cerra, S. Raza, G.A. Andres, J.H. Siegel. The endothelial damage of pulsatile renal preservation and its relationship to perfusion pressure and colloid osmotic pressure. Surg. 1977, 81, 534.
7. A.S. Hermreck, M.T. McCoy, J.L. Shuss, T.W. Tatlock, R.I. McArthur. The study of oliguric and polyuric acute renal failure. J. of Surg. Res., 1975, 18, 285.
8. J. Flores, D.R. DiBona, C.H. Beck, A. Leaf. The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute. J. Of Clin. Invest. 1972, 51, 118.
9. W.F. Finn, W.J. Arendshorst, C.W. Gottschalk. Pathogenesis of oliguria in acute renal failure. Circ.Res. 1975, 36, 675.
10. F.O. Belzer, B.S. Ashby, J.S. Huang, J.E. Dunphy. Etiology of rising perfusion pressure in isolated organ perfusion. Ann. Surg. 1968, 168, 382.
11. A.R. Moossa, C.K. Zarins, D.B. Skinner. In situ kidney preservation for transplantation with use of profound hypothermia (5-20° C) with an intact circulation. Surg. 1976, 79, 60.
12. J.W. Crowell, C.E. Jones, E.E. Smith. Effect of allopurinol on hemorrhagic shock. Am. J. of Physiol. 1969, 216, 744.
13. H.G. Swann. The functional distension of kidney. Tex.Rep.Biol. Med, 1960, 18, 566.

14. H.W.M. Stahl. Local and systemic factors affecting renal tissue tension
J.Surg.Res. 1965, 5, 508.
15. W.F. Hendry, N.N. Struthers, W.P. Duguid, I. Hopkinson. Observation
on kidneys stored by continuous hypothermic perfusion and hyperbaric
oxygen. Br.J. of Surg. 1968, 55, 431.
16. T. Agishi, E.C. Pierce, B.B. Kent. Pulsatile and non-pulsatile blood flow.
JAMA, 1965, 191, 657.
17. Les grandes techniques au service de la médecine moderne. Publication
No 2 / I Laboratoire Dausse.
18. Dr. Holger Nyström (+) Comm. Person.
19. S.J. Sarnoff Case R.B., Welch Gilt, Braunwald E., Stainsby W.N.
Performance characteristic and oxygen debt in a nonfailing metabolically
supporte, isolated heart preparation. Am. J. Physiol., 1958, 192, 141.
20. K.E. Karlson, C. Dennis, D. Westover, S. Sanderson. Pump-oxygenator
to supplant the heart and lungs for brief periods. Surg. 1951, 29, 678.
21. M. Weber, J. Bircher, A. Halpern, J. Tauber, H. Strebel, H. Stirne-
mann, E. Scholl, R. Preisig.
- Substitution of the liver I Eur. J. of Clin. Biol. Res. 1971, 16, 917.
- " " " " II " " " " " " 1972, 17, 77
22. W. Geertz, K. Dyor, D. Johnson, B. Miller, B. Taylor, W. Sharp. PVC
biomedical products : toxicity testing and identification of additives-
A.S.A.I.O. 1974, XX, 42.
23. M.C. Cabrol, A. Cabrol, N. Huré, P. Vayre, J. Portoukalian. Les fac-
teurs de succès ou d'échec dans les circulations extracorporelles expéri-
mentales. J. Chir. 1960, 80, 490.
24. A.J. Landé, S.J. Dos, R.G. Carlson, R.A. Perschau, R.P. Lange,
L.S. Soustegard, W. Lillehei. A new membrane Oxygenator-Dialyser. Surg.
Clin. N.Am. 1967, 47, 1461.
25. T.V. Thomas, A. Heilbrunn, S.R. Lucas. Biochemical response to
cardiopulmonary bypass : Clinical evaluation of disc and bubble oxygenators
with and without coronary perfusion. J. Cardiovasc. Surg. 1971, 12, 9.
26. R.G. Carlson, A.J. Landé, V.A. Subramanian, J. Twichell, J. Baxter,
J.H. Bloch, W. Lillehei. The Landé-Edwards disposable membrane
oxygenator of aorto-coronary artery-vein by-pass graft operations.
J. Cardiovasc. Surg, 1972, 25, 333.
27. F. Reubi. Néphrologie Clinique.
28. R.F. Madsen, B. Nielsen, O.J. Olsen, F. Raaschou. Reverse osmosis
as a method of preparing dialysis water. Nephron, 1970, 7, 545.
29. R.H. Jaffé. The reticulo-endothelial system in immunity. Physiol. Rew.
1931, 11, 277.

30. Jungeblut
31. P.B. Beeson. Tolerance to bacterial pyrogens. *J. of Exp. Med.* 1926, 86, 39.
32. M.S. Litwin, C.W. Walter, P. Ejarque, E.S. Reynolds. Synergistic toxicity of Gram-negative bacteria and free colloidal hemoglobin. *Ann. Surg.*, 1963, 157, 485.
33. G.M. Abounda, J.R. Kirkley et al. Treatment of hepatic coma by extra-corporeal pig liver perfusion. *Lancet*, 1969, 1, 64.
34. C. Davidson, McDermott, C. Trey. Sustaining life during fulminant hepatic failure. *Ann. Intern. Med.* 1969, 71, 415.
35. J.C. Norman, M.E. Brown, C.A. Saravis. Perfusion techniques in temporary human isolated ex vivo porcine liver cross-circulation. *J. Surg. Res.* 1966, 6, 121.
36. L. Zieve, Pathogenesis of hepatic coma. *Arch. Intern. Med.* 1966, 118, 211.
37. C. Trey, D.G. Burns, S.S. Saunders. Treatment of hepatic coma by exchange blood transfusion. *New Eng. J. Med.*, 1966, 274, 473.
38. R.L. Berger, R.M. Liversage, T.C. Chalmers. Exchange transfusion in the treatment of fulminating hepatitis. *New Eng. J. Med.*, 1966, 274, 497.
39. W.M. Riedesel, I. Erdamar, S.S. Dos. Functional preservation of canine heart-lung preparation by perfusion with pure hemoglobin solution. *Nature*, 1973, 243, 530.

